

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
29. März 2001 (29.03.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/21662 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07K 14/815,
14/24, 14/21, 14/245, C12N 9/02, 15/62, 1/21, A61P 7/02

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/08537

(22) Internationales Anmeldedatum:
1. September 2000 (01.09.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 44 870.1 18. September 1999 (18.09.1999) DE

(71) Anmelder: AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND
GMBH [DE/DE]; Brüningstrasse 50, 65929 Frankfurt
(DE).

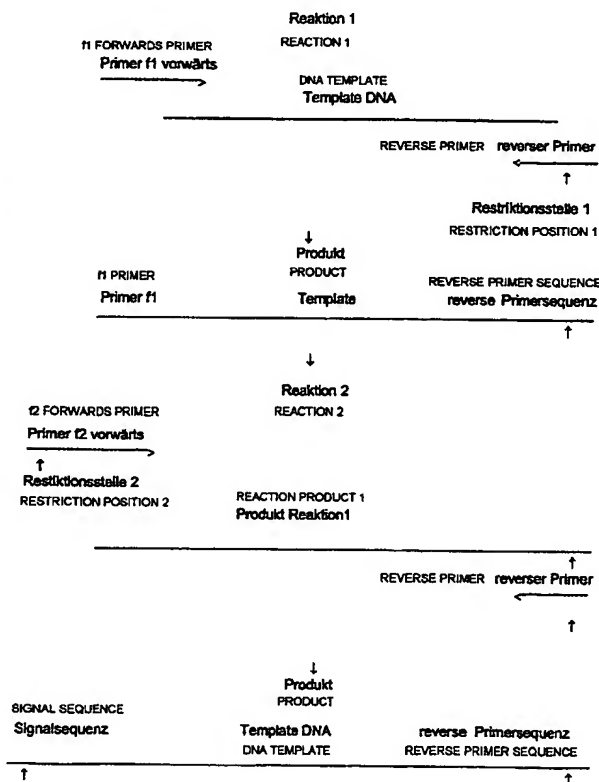
(72) Erfinder: HABERMANN, Paul; Rosserstrasse 35,
65817 Eppstein (DE). BENDER, Rudolf; Kellheimer-
strasse 37, 65812 Bad Soden (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: SIGNAL SEQUENCES FOR THE PRODUCTION OF LEU-HIRUDINE VIA SECRETION BY *E. COLI* IN A CULTURE MEDIUM

(54) Bezeichnung: SIGNALSEQUENZEN ZUR HERSTELLUNG VON LEU-HIRUDIN ÜBER SEKRETION DURCH *E. COLI* IN DAS KULTURMEDIUM



(57) Abstract: The invention relates to a hirudine precursor containing a signal sequence and production of said leu-hirudine, utilization of said sequence and a method for detecting said signal sequences for secretarial expression of any given protein *E. coli* and a method for secretarial expression of any given protein *E. coli*.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf einen Hirudinvorläufer enthaltend eine Signalsequenz und die Sequenz von Leu-Hirudin, seine Herstellung und Verwendung, sowie ein Verfahren zur Ermittlung von Signalsequenzen für die sekretorische Expression von beliebigen Proteinen in *E. coli* und Verfahren zur sekretorischen Expression beliebiger Proteine in *E. coli*.

WO 01/21662 A1



(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— Mit internationalem Recherchenbericht.

— Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Beschreibung

Signalsequenzen zur Herstellung von Leu-Hirudin über Sekretion durch *E.coli* in das Kulturmedium

5

Das vom Blutegel abgeleitete Präparat Refludan® zeigt in der klinischen Prüfung gute therapeutische Eigenschaften (The Lancet, Vol.353, p.429 – 438). Dies läßt den Schluß zu, daß in Zukunft ein größerer Mengenbedarf für das Präparat zu erwarten ist. Der biologische aktive Wirkstoff des Präparates ist das in dem
10 europäischen Patent 0 324 712 beschriebene [Leu¹, Thr²]-63-Desulfato-hirudin, im folgenden kurz „Leu-Hirudin“ genannt.

In dem europäischen Patent 0 448 093 ist ein Verfahren zur Herstellung von Hirudin beschrieben. Die bevorzugte Ausführung des Patentes umfaßt ein Hirudin, dessen
15 N-terminale Aminosäure aus Alanin besteht. Fusioniert man dieses Hirudin mit der Signalsequenz der α -Cyclodextringlykosyltransferase (CGTase) und transformiert einen dieses Fusionsprotein kodierenden Expressionsvektor , wie in dem Patent beschrieben, in eine *E. coli* Sekretormutante, so kann Ala -Hirudin mit Rohausbeuten von größer 2 Gramm pro Liter hergestellt werden. Das europäische
20 Patent 0 549 915 beschreibt Varianten des Ala - Hirudin mit verbesserter Stabilität. Werden diese Varianten mit dem *E. coli* Sekretor System hergestellt, so ergeben sich Ausbeuten von mehreren Gramm pro Liter. Die Ausbeuten sind damit deutlich höher als dies von Dodt *et.al.* für die Hirudinvariante HV1 beschrieben wurde (FEBS LETTERS vol. 202 373 –377, 1986). Eine im Vergleich dazu unwesentliche
25 Steigerung der Ausbeute wird im US Patent 5,573,929 beschrieben, indem anstelle des von Dodt *et al.* pBR322 abgeleiteten Vektors in bekannter Weise die Expressionskassette über einen pUC – Vektor exprimiert wird. Bender *et al.* (Appl. Microbiol Biotechnol 34, p.203 –207 1990) beschreiben die Sekretion im europäischen Patent 0 171 024 beschriebenen Thr - Hirudins durch *Streptomyces*
30 *lividans*. Aber auch hier sind die Ausbeuten im Vergleich zu denen in den europäischen Patenten 0 448 093 und 0 549 915 genannten Ausbeuten deutlich geringer. Dies gilt auch für die Expression in *E.coli* B, wie sie P. de Taxis du Poet *et al.* für die Sekretion der Hirudinvariante HV1 über die Signalsequenz Ompa von *E.*

coli beobachten. Die Autoren finden Ausbeuten von 300mg/l Hirudin im Periplasma und ca. 40 mg/l im Zellüberstand. Die in dem Artikel gleichzeitig beschriebene Expression in Insektenzellsystemen ist gering (400 µg/l).

- 5 Mit den Hefeexpressionssystemen *Hansenula polymorpha* oder *Pichia pastoris* erzielbaren Ausbeuten kommen den in den europäischen Patenten 0 448 093 und 0 549 915 beschriebenen Ausbeuten im Gegensatz zu denen mit *S. cerevisiae* erzielten Werten am nächsten.
- 10 Rosenfeld et al. (Protein Expression and Purification 8 , 476 – 482, 1996) beschreiben die Expression und Sekretion von Hirudin durch die Hefe *Pichia pastoris* . Dabei werden Ausbeuten von ca. 1,5g/l Kulturbrühe erreicht. Eine ähnliche Größenordnung läßt sich mit der Hefe *Hansenula polymorpha* erreichen (Appl. Microbiol. Biotechnol. 44, 377 – 385 1995). Ein erheblicher Nachteil solcher
- 15 Expressionssysteme liegt aber in deutlich längeren Fermentationszeiten gegenüber dem *E.coli* System. Es wäre also vorteilhaft, wenn Leu –Hirudin wie Ala –Hirudin über Sekretion durch *E.coli* herstellbar wäre.

- Dies gelingt aber nicht mit dem in dem europäischen Patent 0 448 093
- 20 beschriebenen System. Deswegen wird in dem Patent vorgeschlagen, die Leu – Hirudin- Sequenz um das Tripeptid Ala – Thr – Arg zu verlängern, so daß ein Prä – Leu – Hirudin entsteht, das schließlich nach Umsetzung mit Trypsin zu dem nativen Wirkstoff Leu – Hirudin umgewandelt wird. Folgt man diesem Vorschlag , so ergeben sich bereits deutlich schlechtere Rohausbeuten im Schüttelkolben-
- 25 experiment, als für Ala-Hirudin beschrieben wurde. Damit ist ein eindeutiger Vorteil gegenüber späteren Hefeexpressionssystemen zunächst nicht mehr klar ersichtlich.

- Die der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe war es demgemäß, ein
- 30 Fusionsprotein herzustellen, bei dem die Kombination aus Signalsequenz und Leu – Hirudin, die direkte Prozessierung zu Leu-Hirudin und anschließende Sekretion von nativem Leu–Hirudin in hohen Ausbeuten durch *E. coli* erlaubt. Dies ist die Voraussetzung zur Entwicklung eines Verfahrens, das sich sowohl in der

Fermentation als auch in der sich anschließenden Reinigung durch die verbesserte Ausgangskonzentration des Hirudin vorteilhaft auf die Herstellkosten von Refludan auswirkt.

Es wurde nun überraschend gefunden, daß Signalsequenzen existieren, die eine direkte Sekretion von Leu-Hirudin durch *E. coli* erlauben und daß dabei sogar eine effizientere Sekretion als im europäischen Patent 0 448 093 beschrieben wurde, beobachtet wird. Damit kann ein Verfahren entwickelt werden, das ohne großen Aufwand hohe Mengen an Leu-Hirudin zugänglich werden läßt. Dies ist Gegenstand der Erfindung.

Um vorteilhafte Signalsequenzen zu finden, wird eine Methode des PCR gestützten Signalsequenz – Screenings eingeführt. Diese Methode benutzt die das Protein von Interesse kodierende DNA als Matrize und einen definierten reversen PCR –Primer, sowie variable vorwärts gerichtete Primer, die die Synthese eines DNA-

Abschnittes, der eine Signalsequenz gekoppelt an ein Gen von Interesse kodiert, erlauben. Die Reaktion läuft nach dem in Figur 1 dargestellten Schema ab. Es ist dem Fachmann klar, daß entsprechend der Länge der zu synthetisierenden Signalsequenz die Zahl der Reaktionsschritte variieren kann. Kurze

Signalsequenzen können mit einem Reaktionsschritt, längere Sequenzen mit zwei, drei oder mehr Reaktionen hergestellt werden. Zudem ist die Zahl der Reaktionen auch abhängig von dem zur Synthese der als Primer benutzten Oligonukleotide verwendeten Gerät. Die so synthetisierte Signalpeptid – Genfusion kann dann gezielt mit den die Restriktionsstellen 1 und 2 erkennenden Enzymen gespalten werden und in einen entsprechend geöffneten Expressionsvektor inseriert werden.

Von allgemeiner Bedeutung wird das System dann, wenn man als Gen von Interesse Hirudin wählt. Die N - terminale Aminosäure von Hirudin kann dabei variabel gewählt werden. Dies führt zwar zu einer gewissen Beeinflussung der Bindung von Hirudin an Thrombin (Veränderung der Bindungskonstante), jedoch bleibt der inhibitorische Effekt von Hirudin bezüglich der Thrombinaktivität meßbar.

Die Patentschrift EP-B1 0 448 093 beschreibt die Sekretion von Hirudin in den Kulturüberstand. Dort ist die Hirudinkonzentration über den bekannten Thrombinhemmtest direkt bestimmbar. Die Hirudinkonzentration ist ein direktes Maß

für die Effizienz der Sekretion und damit der Abspaltung der Signalsequenz. Das Patent beschreibt aber, daß z.B. Hirudin beginnend mit der Aminosäure Leucin nicht effizient über die Signalsequenz der CGT-ase in den Überstand abgegeben werden kann. Mit Hilfe der oben beschriebenen Methode kann man nun nach

- 5 Signalsequenzen suchen, die dies effektiv erlauben. In ähnlicher Weise kann man nun die Sekretion von Hirudinen, die mit einer der übrigen 19 Aminosäuren beginnen, untersuchen. Man erhält so jeweils ein Spektrum von Signalsequenzen, die modellhaft die effiziente Prozessierung der carboxyterminalen Aminosäure des Signalpeptides und daran anknüpfenden peptidischen Restes erlauben. Damit kann
- 10 man eine Vorauswahl an Signalpeptiden zur effizienten Sekretion eines beliebigen Proteines in das Periplasma treffen und so die Chance zur Entwicklung eines vorteilhaften Herstellprozesses für ein Protein erhöhen. Dies ist ebenfalls Gegenstand der Erfindung. Man kann das Verfahren beschleunigen bzw. automatisieren, indem man das Transformationsgemisch aus Ligationsansatz und
- 15 kompetenten Zellen als Flüssigkultur in einem Selektionsmedium über Nacht schüttelt und am nächsten Tag mit einem Aliquot der Zellen wie in Beispiel 11 beschrieben Medium, das Induktor enthält zur Durchführung der Induktion beimpft aber den größten Teil der Kultur zentrifugiert und das Zellpellet wegfriert. Findet man bei der Expression Hirudinaktivität, so kann man das entsprechende
- 20 Expressionsplasmid aus den Zellen reisolieren, linearisieren und gelelektrophoretisch von etwaigen Autoligationsprodukten separieren. Die lineare Plasmid DNA wird dann religiert und erneut in den Wirtstamm transformiert. Nun kann man einzelne Kolonien isolieren und auf ihre Expressionsleistung testen. Dabei kann man so vorgehen, daß das Verfahren Kriterien der
- 25 Arzneimittelzulassung erfüllt.

- Ein weiterer Vorteil des Vorgehens besteht darin, daß man verschiedenen Varianten eines Signalpeptides, wie sie im Lauf der Evolution durch Austausch von Aminosäuren zwischen einzelnen Spezies entstanden sind, leicht nebeneinander im
- 30 Hinblick auf ihre Tauglichkeit zur effizienten Sekretion eines Hirudins untersuchen kann.

Auch ist das Verfahren vorteilhaft gegenüber des Einsatzes von Computer Programmen wie von Nielsen *et al.* (Protein Engineering 10, 1-6, 1997) beschrieben, mit deren Hilfe sich Schnittstellen zwischen Signalsequenz und einem Protein von Interesse vorhersagen lassen. Es zeigt sich jedoch, daß die hiermit zu
5 treffenden Voraussagen nicht in jedem Fall zutreffen, so daß leicht vorteilhafte Kombinationen übersehen werden könnten. Zudem besteht zwischen der Voraussage der korrekten Prozessierung und der tatsächlich erzielbaren Ausbeute keine Beziehung.

- 10 Ein Gegenstand der Erfindung ist ein Hirudinvorläufer enthaltend eine Signalsequenz ausgewählt aus der Gruppe enthaltend die Signalsequenzen des äußeren Membranproteins von *Serratia marcescens*, des oprF-Proteins von *Pseudomonas fluorescens*, des lamb B Proteins von *Escherichia coli*, (kodiert durch das Lambda Rezeptor (lamB) Gen) und der Fumarat-Reduktase von *Shewanella*
15 *putrificiens*, vorzugsweise ausgewählt wird aus der Gruppe enthaltend die Signalsequenz des äußeren Membranproteins von *Serratia marcescens* und der Fumarat Reduktase von *Shewanella putrificiens*, an welche C - terminal die Sequenz von Leu-Hirudin angefügt ist.
- 20 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von Leu-Hirudin, bei welchem als Zwischenstufe ein Hirudinvorläufer wie oben beschrieben vorkommt, bei dem
 - 25 (a) ein Expressionsplasmid enthaltend eine DNA-Sequenz kodierend für den Hirudinvorläufer hergestellt wird;
 - (b) das Expressionsplasmid gemäß (a) in einer geeigneten *E. coli* Zelle exprimiert wird;
 - 30 (c) der Hirudinvorläufer aus *E. coli* sekretiert und gleichzeitig prozessiert wird; und
 - (d) das Leu-Hirudin direkt aus dem Kulturmedium isoliert wird.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung eines Hirudinvorläufers wie oben beschrieben zur Herstellung von Leu-Hirudin, vorzugsweise in einem Verfahren wie oben beschrieben.

5

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Ermittlung eines geeigneten Signalpeptids zur sekretorischen Expression eines beliebigen Proteins in *E. coli*, wobei

- 10 (a) Hirudin oder ein Hirudinderivat mit antithrombotischer Wirkung, welches eine definierte Aminosäure As_x an seinem N -Terminus hat, welcher sich N - terminal an ein zu testendes Signalpeptid anschließt, in *E. coli* exprimiert wird;
- (b) die Expressionsrate durch Messung der Hirudinaktivität im Kulturüberstand bestimmt wird;
- (c) die Schritte (a) und (b) mit verschiedenen Signalpeptiden wiederholt werden;
- 15 (d) ein geeignetes Signalpeptid durch Vergleich der durch die gemäß Schritt (b) ermittelten Hirudinaktivitäten repräsentierten Expressionsraten ausgewählt wird.

- Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von Hirudin oder einem
- 20 Hirudinderivat mit antithrombotischer Wirkung, welches eine definierte Aminosäure As_x an seinem N-Terminus hat, zur Ermittlung eines Signalpeptids, welches die effiziente Sekretion eines Vorläuferproteins bestehend aus dem Signalpeptid und einem beliebigen anderen Protein mit der N-terminalen Aminosäure As_x , bei gleichzeitiger Abspaltung des Signalpeptids aus *E. coli*, ermöglicht, insbesondere
- 25 wobei As_x gleich Leucin ist.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines beliebigen Proteins durch sekretorische Expression in *E. coli*, wobei

- 30 (a) ein geeignetes Signalpeptid gemäß dem Verfahren zur Ermittlung eines geeigneten Signalpeptids, ermittelt wird;

- (b) ein Nukleinsäurekonstrukt kodierend für ein Vorläuferprotein bestehend aus dem geeigneten Signalpeptid gemäß (a) und dem beliebigen Protein in *E. coli* exprimiert wird; und
- (c) das beliebige Protein aus dem Kulturüberstand isoliert wird,

5

insbesondere, wobei die N-terminale Aminosäure des gewünschten Proteins Leucin ist und die Expression über ein Nukleinsäurekonstrukt erfolgt, bei welchem die das Signalpeptid umfassende Sequenz kodiert für ein Signalpeptid ausgewählt aus der Gruppe enthaltend das äußere Membranprotein von *Serratia marcescens*, das oprF-Proteins von *Pseudomonas fluorescens*, das lamb B Proteins von *Escherichia coli*,
10 und die Fumarat-Reduktase von *Shewanella putrifaciens* .

Beispielhaft soll die Synthese von Signalsequenzen, die die effiziente Synthese und Sekretion von Leu-Hirudin erlauben, beschrieben werden. Ebenfalls wird die
15 Synthese anderer Signalsequenzen, die nicht oder hinsichtlich der Ausbeute mit schlechteren Ergebnissen zum Ziel führten, beschrieben. Die Beispiele sollen dabei den Gedanken der Erfindung anhand der Auswahl von Signalsequenzen anhand von Leu-Hirudin erläutern, jedoch nicht darauf beschränkt sein.

20 Die beschriebenen Verfahren können zur Aufreinigung von Refludan verwendet werden; dies ist beispielsweise in Beispiel 11 beschrieben.

Beispiel 1 : Synthese eines Fusionsgenes kodierend für ein Fusionsprotein bestehend aus Leu-Hirudin und der Signalsequenz des äußeren Membranproteins
25 aus *Serratia marcescens*

Als Expressionsplasmid wird der im europäischen Patent 0 468 539 in Figur 1 beschriebene Vektor pJF118 verwendet, da dieser bzgl. seines Grundgerüsts mit dem im europäischen Patent 0 448 093 beschriebenen Vektor pCM7053 identisch
30 ist.

Als Matrize wird das im europäischen Patent 0 448 093 in Beispiel 1 genannte Plasmid pK152 verwendet, das die Hirudinsequenz entsprechend dem europäischen Patent 0 171 024 trägt.

- 5 Das Membranprotein wurde von Braun, G. und Cole, S.T: (Mol.Gen.Genet. 195, 321-328 , 1984) beschrieben.

Zur Synthese des gewünschten DNA – Abschnittes werden drei Oligonukleotidsequenzen hergestellt.

10

Oligonukleotid hirrev hat die Sequenz :

5' TTTTTTAAAG CTTGGGCTGC AGGTC 3' [SEQ ID NO: 1]

HindIII

- 15 Der Primer hybridisiert gegen die Region 227 –210 bp des in der Tabelle 1 dargestellten Hirudingenes.

Primer smompaf1 hat die Sequenz:

- 20 5'-TGGCACTGGC AGGTTTCGCT ACCGTAGCGC AAGCCcttac gtatactgac tgca – 3'
[SEQ ID NO: 2]

Der Primer hybridisiert gegen die Nukleotide 1-19 der in Tabelle 1 dargestellten Hirudinsequenz. Der hybridisierende Teil der Primersequenz ist mit kleinen

- 25 Buchstaben symbolisiert. Der Rest der Sequenz hybridisiert gegen die Region 229bp –263 bp der von Braun,G. und Cole,S.T. (Mol. Gen. Genet. 195, 321-328, 1984) publizierten Sequenz.

Primer smompaf2 hat die Sequenz :

30

5'- tttttgaat tcATGAAAAA GACAGCTATC GCATTAGCAG TGGCACTGGC AGGTTTC – 3'
[SEQ ID NO: 3]

Ab Position 13 bp hybridisiert die Primersequenz mit der von Braun und Cole publizierten Sequenz von 201bp – 245bp und überlappt somit mit der Primersequenz smompaf2. Die Position 1- 12 des Primers enthält eine Erkennungsstelle für das Restriktionsenzym *EcoRI* sowie angrenzend sechs T-Nukleotide, um die Erkennung durch das Enzym zu ermöglichen.

In einer Standard – PCR (wie z.B. 94°C :10'', 50 °C: 30'', 72°C: 45'', 25 Zyklen) mit DNA des Plasmides pK152 als Matrize, das die in Tabelle 1 beschriebene Sequenz trägt, und den Primern hirrev und smompaf1 wird die Hirudinsequenz um die bakterielle Teilsignalsequenz verlängert. Das Reaktionsprodukt wird dann in einer zweiten PCR als Template mit den Primern hirrev und smompaf2 unter gleichen Bedingungen umgesetzt. Als Reaktionsprodukt entsteht ein DNA-Fragment, das für ein Fusionsprotein kodiert, welches aus der um die gewünschte Signalsequenz verlängerten Hirudinsequenz besteht. Am 5'Ende findet sich die Erkennungsstelle für das Restriktionsenzym *EcoRI* und am 3' Ende die Erkennungsstelle für das Enzym *HindIII*.

Das Reaktionsprodukt der zweiten PCR wird in einem Doppelverdauansatz mit den beiden Restriktionsenzyme umgesetzt und als *EcoRI/ HindIII* Fragment in die mit den beiden Enzymen geöffnete Vektor DNA in einer T4 – DNA – Ligasereaktion inseriert. Kompetente Zellen des Stammes *E. coli* Mc1061 oder der Sekretor - Mutante WCM100 werden mit dem Ligationsgemisch transformiert und unter Selektionsdruck auf Ampicillin-haltigen Platten vermehrt. Am nächsten Morgen erfolgt dann die Expression gemäß Beispiel 6 im Vergleich zur Ala-Hirudinexpression mit dem Stamm *E. coli* WCM100 / pCM7053. Es zeigt sich , daß die erzielte Expression ca. 1,5 mal besser ist als im Vergleichsversuch.

Beispiel 2 : Synthese des Fusionsproteins aus Leu-Hirudin und der Signalsequenz des oprF - Genproduktes aus *Pseudomonas fluorescens*

Die Konstruktion erfolgt entsprechend dem in Beispiel 1 beschriebenen Schema mit Ausnahme, daß anstelle der Primer smompaf1 / f2 zwei neue Primer benutzt werden, die bezüglich ihrer Spezifität für das Hirudingen und der Sequenz zur

Erkennung durch das Restriktionsenzym *EcoRI* die gleichen Merkmale wie die smompa –Primer aufweisen, aber für die gewünschte Signalsequenz des oprF – Genes (De, E. et al.: FEMS Microbial. Lett. 127, 267 –272 , 1995) kodieren.

5

Primer pfuf1 hat die Sequenz:

5'GGTTCTCTTA TTGCCGCTAC TTCTTTCGGC GTTCTGGCAc ttacgtatac tgactgca 3'0
[SEQ ID NO: 4]

10 Primer pfuf2 hat die Sequenz :

5'tttttgaat tcatgAAAAA CACCTTGGGC TTGGCCATTG GTTCTCTTAT TGCCGC 3'
[SEQ ID NO: 5]

15 Dabei wird der Primer pfuf1 entsprechend Beispiel 1 in PCR1 und der Primer pfuf2 entsprechend in der PCR2 verwendet. Die Expression wird im Vergleich zur Ala- Hirudinexpression mit dem Stamm *E. coli* WCM100 / pCM7053 durchgeführt. Es zeigt sich, daß die erzielte Expression ca. 1,1 mal besser ist , als im Vergleichsversuch. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung im SDS- PAGE System wird die Hirudinbande isoliert und die N- terminale Sequenz des Hirudins bestimmt.

20 Es zeigt sich , daß die Sequenz vollständig intakt ist und mit der Aminosäure Leucin beginnt. Dieses Ergebnis ist überraschend, da das Programm zur Identifikation der putativen Signalpeptidaseerkennungsstelle eine Verlängerung des Hirudins um Valin voraussagt.

25 Beispiel 3 : Synthese des Fusionsproteins aus Leu-Hirudin und der Signalsequenz des lamB Genproduktes aus *E. coli*

Die Konstruktion erfolgt entsprechend dem in Beispiel 1 beschriebenen Schema mit Ausnahme, daß anstelle der Primer smompaf1 / f2 zwei neue Primer benutzt werden, die bezüglich ihrer Spezifität für das Hirudingen und der Sequenz zur

30 Erkennung durch das Restriktionsenzym *EcoRI* die gleichen Merkmale wie die smompa –Primer aufweisen, aber für die gewünschte Signalsequenz des lamB – Genes (Clement,J.M. and Hofnung, M. : Cell 27, 507 –514, 1981) kodieren.

Primer lambbf1 hat die Sequenz:

5' GTTGCCGTCG CAGCGGGCGT AATGTCTGCT CAGGCAATGG CTcttacgta tactgactgc a 3'
[SEQ ID NO: 6]

5

Primer lambbf2 hat die Sequenz :

5'tttttgaat tcATGATGAT TACTCTGCGC AAACCTCCTC TGGCGGTTGC CGTCGCAGC 3'
[SEQ ID NO: 7]

10

Dabei wird der Primer lambbf11 entsprechend Beispiel 1 in PCR1 und der Primer lambbf2 entsprechend in der PCR2 verwendet. Die Expression wird im Vergleich zur Ala- Hirudinexpression mit Stamm *E. coli* WCM100 / pCM7053 durchgeführt. Es zeigt sich , daß die erzielte Expression gleich hoch ist wie im Vergleichsversuch. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung im SDS- PAGE System wird die Hirudinbande isoliert und die N- terminale Sequenz des Hirudins bestimmt. Es zeigt sich , daß die Sequenz vollständig intakt ist und mit der Aminosäure Leucin beginnt. Dieses Ergebnis ist überraschend, da das Programm zur Identifikation der putativen Signalpeptidaseerkennungsstelle die korrekte Prozessierung von Hirudin nicht voraussagt.

15

20

Beispiel 4: Synthese des Fusionsproteins aus Leu-Hirudin und der Signalsequenz des Vorläufers der Fumarat Reduktase Flavoprotein Untereinheit aus *Shewanella putrefaciens*

25

Die Konstruktion erfolgt entsprechend dem in Beispiel 1 beschriebenen Schema mit Ausnahme, daß anstelle der Primer smompaf1 / f2 zwei neue Primer benutzt werden, die bezüglich ihrer Spezifität für das Hirudingen und der Sequenz zur Erkennung durch das Restriktionsenzym *EcoRI* die gleichen Merkmale wie die smompa -Primer aufweisen, aber für die gewünschte Signalsequenz aus *Shewanella putrefaciens* (Pealing S.L. et al.: Biochemistry 31, 12132 – 12140, 1992) kodieren. Da die Publikation nur die Proteinsequenz beschreibt, wird die

30

Aminosäuresequenz entsprechend der Codon – Tabellen in eine DNA – Sequenz übersetzt, so daß sich für den

5

Primer spfccf1 folgende Sequenz ergibt:

5' CTACCCTGAT GGGTACCGCT GGTCTGATGG GTACCGCTGT TGCTcttacg tatactgact gca 3'
[SEQ ID NO: 8]

10

Primer spfccf2 hat die Sequenz :

5'tttttgaat tcATGAAAAA AATGAACCTG GCTGTTTGCA TCGCTACCCT GATGGGTACC 3'
[SEQ ID NO: 9]

15

Dabei wird der Primer spfccf1 entsprechend Beispiel 1 in der PCR1 und der Primer spfccf2 entsprechend in der PCR2 verwendet. Die Expression wird im Vergleich zur Ala- Hirudinexpression mit Stamm *E. coli* WCM100 / pCM7053 durchgeführt. Es zeigt sich, daß die erzielte Expression ca. 1,5 mal besser ist als im Vergleichsversuch. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung im SDS PAGE System wird die Hirudinbande isoliert und die N - terminale Sequenz des Hirudins bestimmt. Es zeigt sich, daß die Sequenz vollständig intakt ist und mit der Aminosäure Leucin beginnt. Dieses Ergebnis ist überraschend, da das Programm zur Identifikation der putativen Signalpeptidaseerkennungsstelle eine Prozessierung carboxyständig zu Cystein in Position 6 der Hirudinsequenz voraussagt.

20

25

Beispiel 5 : Synthese des Fusionsproteins aus Leu-Hirudin und der Signalsequenz des Vorläufers der β - Laktamase aus pBR322

30

Die Konstruktion erfolgt entsprechend dem in Beispiel 1 beschriebenen Schema mit Ausnahme, daß anstelle der Primer smompaf1 / f2 zwei neue Primer benutzt werden, die bezüglich ihrer Spezifität für das Hirudingen und der Sequenz zur Erkennung durch das Restriktionsenzym *EcoRI* die gleichen Merkmale wie die smompa –Primer aufweisen, aber für die gewünschte Signalsequenz des β -

Laktamase – Vorläuferproteines (Sutcliffe J.G.; Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43:77-90 (1978)) kodieren.

5

Primer blatf1 hat folgende Sequenz :

5' CTGATCCCGT TCTTTGCAGC GTTCTGCCTG CCGGTTTTTCG CGcttacgta tactgactgc a 3'
[SEQ ID NO: 10]

10

Primer blatf2 hat die Sequenz :

5' tttttgaat tcATGTCCAT CCAGCACTTC CGCGTCGCCC TGATCCCGTT CTTTGC 3'
[SEQ ID NO: 11]

15

Dabei wird der Primer blatf1 entsprechend Beispiel 1 in der PCR1 und der Primer blatf2 entsprechend in der PCR2 verwendet. Die Expression wird im Vergleich zur Ala-Hirudinexpression mit Stamm *E. coli* WCM100 / pCM7053 durchgeführt. Es zeigt sich , daß die erzielte Expressionausbeute nur 50% - 90% der im Vergleichsversuch

20 erzielten Ausbeute beträgt. Nach gelektrophoretischer Auftrennung im SDS PAGE System wird die Hirudinbande isoliert und die N- terminale Sequenz des Hirudins bestimmt. Es zeigt sich , daß die Sequenz vollständig intakt ist und mit der Aminosäure Leucin beginnt. Dieses Ergebnis wurde durch das Programm zur Identifikation der putativen Signalpeptiderkennungsstelle vorausgesagt.

25

Beispiel 6 : Synthese des Fusionsgenes aus Leu-Hirudin und der Signalsequenz des Vorläufers der alkalischen Phosphatase aus *E. coli*

30 Die Konstruktion erfolgt entsprechend dem in Beispiel 1 beschriebenen Schema mit Ausnahme, daß anstelle der Primer smompaf1 / f2 zwei neue Primer benutzt werden , die bezüglich ihrer Spezifität für das Hirudingen und ihrer Sequenz zur Erkennung durch das Restriktionsenzym *EcoRI* die gleichen Merkmale wie die

smompa –Primer aufweisen, aber für die gewünschte Signalsequenz des alkalischen Phosphataseproteins aus *E. coli* (Shuttleworth, H., Taylor, J. and Minton, N. Nucleic Acids Res. 14 (21), 8689 (1986)) kodieren.

- 5 Primer linkphoaf1 hat folgende Sequenz :

5' GCTGCCGCTG CTGTTACCCC CGGTTACCAA AGCGcttacg tatactgact gca 3'
[SEQ ID NO.: 12]

- 10 Primer linkphoaf2 hat die Sequenz :

5' tttttgAAT TCATGAAACA GTCGACCATC GCGCTGGCGC TGCTGCCGCT GCTGTTC 3'
[SEQ ID NO.: 13]

- 15 Die beiden Primer sind bzgl. der Codonwahl für *E. coli* optimiert, d.h. sie entsprechen nicht vollständig der natürlichen Sequenz des Ausgangsgenes.

Dabei wird der Primer linkphoaf1 entsprechend Beispiel 1 in PCR1 und der Primer linkphof2 entsprechend in der PCR2 verwendet. Die Expression wird

- 20 im Vergleich zur Ala - Hirudinexpression mit dem Stamm *E. coli* WCM100 / pCM7053 durchgeführt. Es zeigt sich, daß die erzielte Expressionausbeute nur ein Bruchteil der im Vergleichsversuch erzielten Ausbeute beträgt. Durch geelektrophoretische Auftrennung im SDS PAGE System wird die Hirudinbande isoliert und die N- terminale Sequenz des Hirudins bestimmt. Es zeigt sich , daß die
- 25 Sequenz vollständig intakt ist und mit der Aminosäure Leucin beginnt. Dieses Ergebnis wurde durch das Programm zur Identifikation der putativen Signalpeptidaseerkennungsstelle vorausgesagt. Überraschend ist aber die schlechte Ausbeute.

- 30 Beispiel 7: Synthese des Fusionsgenes aus Leu-Hirudin und der Signalsequenz des Vorläufers der alkalischen Phosphatase aus *E. fergusonii*

Die Konstruktion erfolgt entsprechend dem in Beispiel 1 beschriebenen Schema mit Ausnahme, daß anstelle der Primer smompaf1 / f2 zwei neue Primer benutzt werden, die bezüglich ihrer Spezifität für das Hirudingen und ihrer Sequenz zur Erkennung durch das Restriktionsenzym *EcoRI* die gleichen Merkmale wie die smompa – Primer aufweisen, aber für die gewünschte Signalsequenz des alkalischen Phosphataseproteins aus *E. fergusonii* (Du Bose, R.F. and Hartl, D.L. Mol. Biol. Evol. 7, 547-577 (1990)) kodieren.

Diese Signalsequenz unterscheidet sich an fünf Positionen von der der alkalischen Phosphatase aus *E. coli*.

Primer fergusf1 hat folgende Sequenz :

5' GCTGAGCTGC CTGATCACCC CGGTGTCCCA GGCGcttacg tatactgact gca 3'
[SEQ ID NO.: 14]

Primer fergusf2 hat die Sequenz :

5' tttttgaat tcATGAAACA GAGCGCGATC GCGCTGGCTC TGCTgAGCTG CCTGATC 3'
[SEQ ID NO.: 15]

Die beiden Primer sind bzgl. der Codonwahl für *E.coli* optimiert, d.h. sie entsprechen nicht vollständig der natürlichen Sequenz des Ausgangsgenes. Dabei wird der Primer fergusf1 entsprechend Beispiel 1 in PCR1 und der Primer fergusf2 entsprechend in der PCR2 verwendet. Die Expression wird im Vergleich zur Ala - Hirudinexpression mit Stamm *E. coli* WCM100 / pCM7053 durchgeführt. Es zeigt sich, daß die erzielte Expressionausbeute nur ein Bruchteil der im Vergleichsversuch erzielten Ausbeute beträgt. Sie ist nochmals um etwa die Hälfte geringer, als dies für die mit dem Konstrukt aus Signalpeptid von *E.coli* alkalischer Phosphatase und Leu-Hirudin beobachtet wird.

Beispiel 8 : Synthese des Fusionsgenes aus Leu-Hirudin und der Signalsequenz des Vorläufers der Cyclodextrin Glucanotransferase aus *Paenibacillus macerans*

Die Konstruktion erfolgt entsprechend dem in Beispiel 1 beschriebenen Schema mit Ausnahme, daß anstelle der Primer smompaf1 / f2 zwei neue Primer benutzt werden, die bezüglich ihrer Spezifität für das Hirudingen und ihrer Sequenz zur Erkennung durch das Restriktionsenzym *EcoRI* die gleichen Merkmale wie die smompa-Primer aufweisen, aber für die gewünschte Signalsequenz des Cyclodextrin Glucanotransferase Genes aus *Paenibacillus macerans* (Takano, T., Fukuda, M., Monma, M., Kobayashi, S., Kainuma, K. and Yamane, K. J. Bacteriol. 166, 1118-1122 (1986)) kodieren.

Primer baccdgf1 hat folgende Sequenz :

5' CTTTCGCTGA GTATGGCGTT GGGGATTTC A CTGCCCGCAT GGGCActtac
gtatactgac tgca 3' [SEQ ID NO.: 16]

Primer baccdgf2 hat die Sequenz :

5' tttttgaat tcATGAAATC GCGGTACAAA CGTTTGACCT CCCTGGCGCT
TTCGCTGAGT ATGGC 3' [SEQ ID NO.: 17]

Dabei wird der Primer baccdgf1 entsprechend Beispiel 1 in PCR1 und der Primer baccdgf2 entsprechend in der PCR2 verwendet. Die Expression wird im Vergleich zur Ala - Hirudinexpression mit Stamm *E. coli* WCM100 / pCM7053 durchgeführt. Es zeigt sich, daß die erzielte Expressionausbeute ca. 1/4 der im Vergleichsversuch erzielten Ausbeute beträgt. Das synthetisierte Hirudin verhält sich im Thrombinhemmttest wie Leu-Hirudin. Dies bedeutet, daß das Signalpeptid korrekt prozessiert wurde. Dies entspricht nicht der Erwartung aus der theoretischen Analyse, die auf einen um 8 Aminosäuren verlängerten oder alternativ um zwei Aminosäuren verkürzten N - Terminus hindeutete.

Beispiel 9 : Synthese des Fusionsgenes aus Leu-Hirudin und der Signalsequenz des *E. coli* PCFO20 Fimbrillin Vorläuferproteins (fotA)

Die Konstruktion erfolgt entsprechend dem in Beispiel 1 beschriebenen Schema mit Ausnahme, daß anstelle der Primer smompaf1 / f2 zwei neue Primer benutzt werden, die bezüglich ihrer Spezifität für das Hirudingen und ihrer Sequenz zur Erkennung durch das Restriktionsenzym *EcoRI* die gleichen Merkmale wie die smompa-Primer aufweisen, aber für die gewünschte Signalsequenz des *E. coli* PCFO20 Fimbrillin Vorläuferproteins (Viboud, G.I., Jonson, G., Dean-Nystrom, E. and Svennerholm, A.M. Infect. Immun. 64 (4), 1233-1239 (1996)) kodieren.

Primer pcf1-ala hat folgende Sequenz :

5' TGGTTTCAGC TTTAGTAAGC GGGGTTGCAT TTGCTCTTAC GTATACTGAC
TGCAC 3' [SEQ ID NO.: 18]

Primer p-pcf2 hat die Sequenz :

5' TTTTGGGAAT TCATGAAAAA GACAATTATG TCTCTGGCTG TGGTTTCAGC
TTTAGTAAGC 3' [SEQ ID NO.: 19]

Dabei wird der Primer pcf1-ala entsprechend Beispiel 1 in PCR1 und der Primer p-pcf2 entsprechend in der PCR2 verwendet. Die Expression wird im Vergleich zur Ala - Hirudinexpression mit Stamm *E. coli* WCM100 / pCM7053 durchgeführt. Es zeigt sich, daß die erzielte Expressionausbeute ca 40% der im Vergleichsversuch erzielten Ausbeute beträgt.

Beispiel 10 : Synthese des Fusionsgenes aus Leu-Hirudin und der Signalsequenz des *S. typhimurium* Outer Membrane Protein (fimD)

Die Konstruktion erfolgt entsprechend dem in Beispiel 1 beschriebenen Schema mit Ausnahme, daß anstelle der Primer smompaf1 / f2 zwei neue Primer benutzt werden, die bezüglich ihrer Spezifität für das Hirudingen und ihrer Sequenz zur Erkennung durch das Restriktionsenzym *EcoRI* die gleichen Merkmale wie die smompa-Primer aufweisen, aber für die gewünschte Signalsequenz des *S.*

typhimurium Outer Membrane Proteins (Rioux, C.R., Friedrich, M.J. and Kadner, R.J.; J. Bacteriol. 172 (11), 6217-6222 (1990)) kodieren.

- 5 Primer styfimf1 hat folgende Sequenz :

5' CGGCGCTGAG TCTCGCCTTA TTTTCTCACC TATCTTTTGC Ccttacgtat actgactgca 3'
[SEQ ID NO.: 20]

- 10 Primer styfimf2 hat die Sequenz :

5' tttttgaat tcaTGTCATT TCATCACCGG GTATTAAAC TGTCGGCGCT GAGTCTC 3'
[SEQ ID NO.: 21]

- 15 Dabei wird der Primer styfimf1 entsprechend Beispiel 1 in PCR1 und der Primer styfimf2 entsprechend in der PCR2 verwendet. Die Expression wird im Vergleich zur Ala - Hirudinexpression mit Stamm *E. coli* WCM100 / pCM7053 durchgeführt. Es zeigt sich , daß die erzielte Expressionausbeute ca 10% der im Vergleichsversuch erzielten Ausbeute beträgt.

20

Beispiel 11: Expression in *E. coli*

- Das Beispiel beschreibt die Expression des Hirudin. Dazu werden je 1 –5ml LB-
25 Medium, das 25mg/l Ampicillin enthält und 0,5 - 2mM IPTG (Isopropyl β -D-Thiogalactopyranoside) mit Zellen einer Transformante beimpft und ca. 20 Stunden bei 28°C im Brutschüttler bei 220 rpm geschüttelt. Anschließend wird nach Bestimmung der optischen Dichte die Zellsuspension zentrifugiert und Hirudin aus dem klaren Überstand bestimmt.

30

Parallel zur Expression von Refludan wird die Expression des in dem europäischen Patent 0 448 093 beschriebene Ala- Hirudin über das Plasmid pCM7053 in der in

dem Patent beschriebenen Sekretormutante WCM100 durchgeführt. Damit wird ein direkter Vergleich der Expressionsrate möglich.

Die Expression im größeren Maßstab kann entsprechend dem US Patent 5,616,476
5 erfolgen. Refludan kann dann entsprechend der in diesem Patent in den Beispielen
5 und 6 beschriebenen Methoden gereinigt werden.

Beispiel 12 : Bestimmung der Hirudinkonzentration

10 Die Bestimmung der Hirudinkonzentration wird entsprechend der Methode von
Grießbach *et al.* (Thrombosis Research 37, 347 –350 , 1985) durchgeführt. Dazu
werden definierte Mengen eines Refludanstandards zur Erstellung einer Eichkurve in
die Meßreihe mit einbezogen . Damit kann die Ausbeute direkt in mg /l angegeben
werden.

15

20

Tabelle 1 : Kodierende DNA – Sequenz für Hirudin mit Übersetzung in Aminosäuren

1 CTTACGTATACTGACTGCACTGAATCTGGTCAGAACCTGTGCCTGTGCGAAGGATCTAAC 60

25

L T Y T D C T E S G Q N L C L C E G S N -

61 GTTTGCGGCCAGGGTAACAAATGCATCCTTGGATCCGACGGTGAAAAGAACCAGTGC GTT 120

30

V C G Q G N K C I L G S D G E K N Q C V -

121 ACTGGCGAAGGTACCCCGAAACCGCAGTCTCATAACGACGGCGACTTCGAAGAGATCCCT 180

35

T G E G T P K P Q S H N D G D F E E I P -

181 GAGGAATACCTTCAGTAATAGAGCTCGTCGACCTGCAGCCCAAGCTT 227

[SEQ ID NO.: 22]

40

E E Y L Q * * -----

[SEQ ID NO.: 23]

45

Tabelle 2:

| Beispiel | Signalsequenz | Primärstruktur | Relative Ausbeute pro ml Kultur | SEQ ID NO.: |
|----------|---|----------------------------------|---------------------------------|-------------|
| - | Kontrolle : cgtase -Ala – Hirudin | MKRNRFFNTS AAIAISIALNTFF CSMQTIA | 1 | 24 |
| 1 | äußeres Membranprotein / <i>Serratia marcescens</i> | MKKTAIALAVALAGFATVAQ A | 1,5 | 25 |
| 2 | oprF – Protein / <i>Pseudomonas fluorescens</i> | MKNTLGLAIGSLIAATSFGV LA | 1,1 | 26 |
| 3 | lambB –Protein / <i>E.coli</i> | MMITLRKLPL AVAVAAGVMS AQAMA | 1 | 27 |
| 4 | Fumat Reduktase / <i>Shewanella putrifaciens</i> | MKKMNLAHCI ATLMGTAGLM GTAVA | 1,5 | 28 |
| 5 | β - Lactamase / pBR322 | MSIQHFRVAL IPFFAAFSLPVFA | 0,5 | 29 |
| 8 | alk. Phosphatase / <i>E.coli</i> | MKQSTIALAL LPLLFTPVTK A | 0,1 | 30 |
| 9 | alk. Phosphatase / <i>E. fergusonii</i> | MKQSAIALAL LSCLITPVSQ A | 0,05 | 31 |
| 10 | Cyclodextrin Glucanotransferase / <i>Paenibacillus macerans</i> | MKSRYKRLTS LALSLSMALGI SLPWA | 0,25 | 32 |
| 11 | Outer Membrane Protein / <i>S. typhimurium</i> | MSFHHRVFKL SALSALFSH LSFA | 0,11 | 33 |

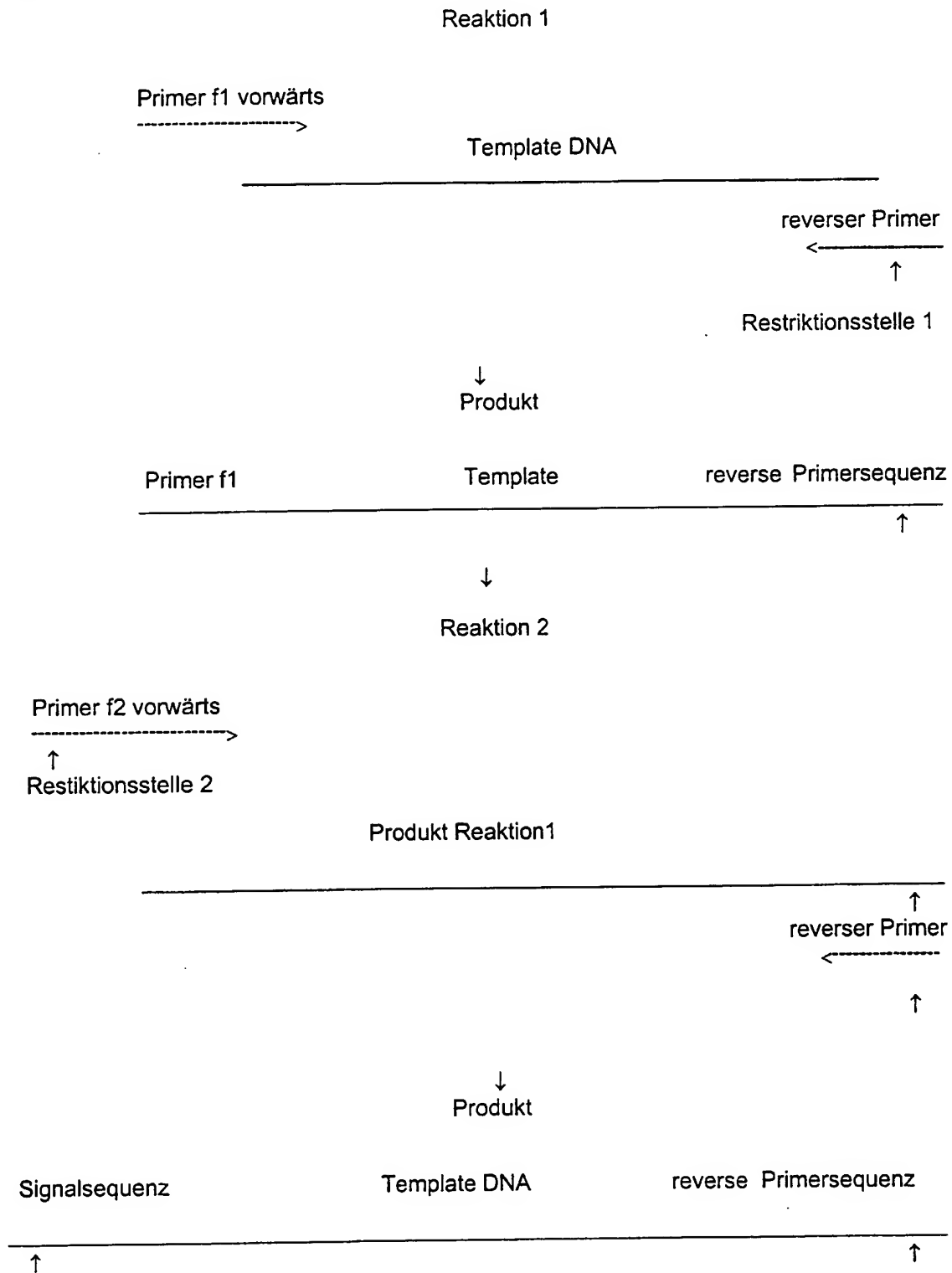
Patentansprüche:

1. Hirudinvorläufer enthaltend eine Signalsequenz ausgewählt aus der Gruppe enthaltend die Signalsequenzen des äußeren Membranproteins von *Serratia marcescens*, des oprF-Proteins von *Pseudomonas fluorescens*, des lamb B Proteins von *Escherichia coli*, und der Fumarat-Reduktase von *Shewanella putrifaciens*, an welche C-terminal die Sequenz von Leu-Hirudin angefügt ist.
2. Hirudinvorläufer gemäß Anspruch 1, wobei die Signalsequenz ausgewählt wird aus der Gruppe enthaltend die Signalsequenz des äußeren Membranproteins von *Serratia marcescens* und der Fumarat-Reduktase von *Shewanella putrifaciens*.
3. Verfahren zur Herstellung von Leu-Hirudin, bei welchem als Zwischenstufe ein Hirudinvorläufer gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2 vorkommt, bei dem
 - (a) ein Expressionsplasmid enthaltend eine DNA-Sequenz kodierend für den Hirudinvorläufer hergestellt wird;
 - (b) das Expressionsplasmid gemäß (a) in einer geeigneten *E. coli* Zelle exprimiert wird;
 - (c) der Hirudinvorläufer aus der *E. coli* sekretiert und gleichzeitig prozessiert wird; und
 - (d) das Leu-Hirudin aus dem Kulturmedium isoliert wird.
4. Verwendung eines Hirudinvorläufers gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2 zur Herstellung von Leu-Hirudin.
5. Verwendung eines Hirudinvorläufers gemäß Anspruch 4 in einem Verfahren gemäß Anspruch 3.
6. Verfahren zur Ermittlung eines geeigneten Signalpeptids zur sekretorischen Expression eines beliebigen Proteins in *E. coli*, wobei

- (a) Hirudin oder ein Hirudinderivat mit antithrombotischer Wirkung, welches eine definierte Aminosäure As_x an seinem N-Terminus hat, welcher sich N-terminal an ein zu testendes Signalpeptid anschließt, in *E. coli* exprimiert wird;
- (b) die Expressionsrate durch Messung der Hirudinaktivität im Kulturüberstand bestimmt wird;
- (c) die Schritte (a) und (b) mit verschiedenen Signalpeptiden wiederholt werden;
- (d) ein geeignetes Signalpeptid durch Vergleich der durch die gemäß Schritt (b) ermittelten Hirudinaktivitäten repräsentierten Expressionsraten ausgewählt wird.
7. Verwendung von Hirudin oder einem Hirudinderivat mit antithrombotischer Wirkung, welches eine definierte Aminosäure As_x an seinem N-Terminus hat, zur Ermittlung eines Signalpeptids, welches die effiziente Sekretion eines Vorläuferproteins bestehend aus dem Signalpeptid und einem beliebigen anderen Protein mit der N-terminalen Aminosäure As_x , bei gleichzeitiger Abspaltung des Signalpeptids aus *E. coli*, ermöglicht.
8. Verwendung gemäß Anspruch 7, wobei As_x gleich Leucin ist.
9. Verfahren zur Herstellung eines beliebigen Proteins durch sekretorische Expression in *E. coli*, wobei
- (a) ein geeignetes Signalpeptid gemäß dem Verfahren nach Anspruch 6 ermittelt wird;
- (b) ein Nukleinsäurekonstrukt kodierend für ein Vorläuferprotein bestehend aus dem geeigneten Signalpeptid gemäß (a) und dem beliebigen Protein in *E. coli* exprimiert wird; und
- (c) das beliebige Protein aus dem Kulturüberstand isoliert wird.
10. Verfahren zur Herstellung eines beliebigen Proteins in *E. coli* gemäß Anspruch 9, wobei die N-terminale Aminosäure des gewünschten Proteins Leucin ist und die Expression über ein Nukleinsäurekonstrukt erfolgt, bei welchem die für das Signalpeptid kodierende Sequenz kodiert für ein Signalpeptid ausgewählt aus der

Gruppe enthaltend das äußere Membranprotein von *Serratia marcescens*, das oprF-²³Proteins von *Pseudomonas fluorescens*, das lamb B Proteins von *Escherichia coli*, und die Fumarat-Reduktase von *Shewanella putrifaciens*.

Figur 1:



SEQUENZPROTOKOLL

<110> Aventis Pharma Deutschland GmbH

<120> Signalsequenzen zur Herstellung von Leu-Hirudin über
Sekretion durch E.coli in das Kulturmedium

<130> 1999/L055

<140> 19944870.1

<141> 1999-09-18

<160> 33

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 31

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: misc feature

<400> 1

tttttttaag cttgggctgc aggtcsdnhn d

31

<210> 2

<211> 54

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: misc feature

<400> 2

tggcactggc aggtttcgct accgtagcgc aagcccttac gtatactgac tgca

54

<210> 3

<211> 57

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: misc feature

<400> 3

ttttttgaat tcatgaaaaa gacagctatc gcattagcag tggcactggc aggtttc 57

<210> 4

<211> 58

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: misc feature

<400> 4

ggttctctta ttgccgctac ttctttcggc gttctggcac ttacgtatac tgactgca 58

<210> 5

<211> 56

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: misc feature

<400> 5

ttttttgaat tcatgaaaaa caccttgggc ttggccattg gttctcttat tgccgc 56

<210> 6

<211> 61

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: misc feature

<400> 6

gttgccgtcg cagcgggct aatgtctgct caggcaatgg ctcttacgta tactgactgc 60
a 61

<210> 7

<211> 59

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: misc feature

<400> 7
ttttttgaat tcatgatgat tactctgcgc aaacttcctc tggcggttgc cgtcgcagc 59

<210> 8
<211> 63
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: misc feature

<400> 8
ctaccctgat gggtagcgt ggtctgatgg gtaccgctgt tgctcttacg tatactgact 60
gca 63

<210> 9
<211> 60
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: misc feature

<400> 9
ttttttgaat tcatgaaaaa aatgaacctg gctgtttgca tcgctaccct gatgggtacc 60

<210> 10
<211> 61
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: misc feature

<400> 10
ctgatcccggt tctttgcagc gttctgcctg ccgggtttcg cgcttacgta tactgactgc 60
a 61

<210> 11
<211> 56
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: misc feature

<400> 11

ttttttgaat tcatgtccat ccagcacttc cgcgtcgccc tgatcccgtt ctttgc 56

<210> 12

<211> 53

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: misc feature

<400> 12

gctgccgctg ctgttcaccc cggttaccaa agcgcttacg tatactgact gca 53

<210> 13

<211> 57

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: misc feature

<400> 13

ttttttgaat tcatgaaaca gtcgaccatc gcgctggcgc tgctgccgct gctgttc 57

<210> 14

<211> 53

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: misc feature

<400> 14

gctgagctgc ctgatcacc cgggtgccca ggcgcttacg tatactgact gca 53

<210> 15

<211> 57

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: misc feature

<400> 15

ttttttgaat tcatgaaaca gagcgcgatc gcgctggctc tgctgagctg cctgac 57

<210> 16

<211> 64

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: misc feature

<400> 16

ctttcgctga gtatggcggt ggggatttca ctgcccgcac gggcacttac gtatactgac 60
tgca 64

<210> 17

<211> 65

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: misc feature

<400> 17

ttttttgaat tcatgaaatc gcggtacaaa cgtttgacct ccctggcgct ttcgctgagt 60
atggc 65

<210> 18

<211> 55

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: misc feature

<400> 18

tggtttcagc tttagtaagc ggggttgcat ttgctcttac gtatactgac tgcac 55

<210> 19

<211> 60

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: misc feature

<400> 19

ttttgggaat tcatgaaaaa gacaattatg tctctggctg tggtttcagc tttagtaagc 60

<210> 20

<211> 60

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: misc feature

<400> 20

cggcgctgag tctcgcccta tttctcacc tatcttttgc ccttacgtat actgactgca 60

<210> 21

<211> 57

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: misc feature

<400> 21

ttttttgaat tcatgtcatt tcatcacggg gtatttaaagc tgcggcgct gagtctc 57

<210> 22

<211> 267

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: gene

<400> 22

cttacgtata ctgactgcac tgaatctggt cagaacctgt gcctgtgcga aggatctaac 60
 tytdctsgnc cgsngtttgc ggccagggtg acaaatgcat ccttggatcc gacgggtgaaa 120
 agaaccagtg cggttcggnk cgsdgkncva ctggcgaaagg taccgccgaaa ccgcagtctc 180
 ataacgacgg cgacttcgaa gagatccctt ggkshndgd gaggaataacc ttcagtaata 240
 gagctcgtcg acctgcagcc caagctt 267

<210> 23
<211> 5
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: peptide

<400> 23

Glu Glu Tyr Leu Gln
1 5

<210> 24
<211> 30
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: signal

<400> 24

Met Lys Arg Asn Arg Phe Phe Asn Thr Ser Ala Ala Ile Ala Ile Ser
1 5 10 15

Ile Ala Leu Asn Thr Phe Phe Cys Ser Met Gln Thr Ile Ala
20 25 30

<210> 25
<211> 21
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: signal

<400> 25

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Leu Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
1 5 10 15

Thr Val Ala Gln Ala
20

<210> 26
<211> 22
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: signal

<400> 26
Met Lys Asn Thr Leu Gly Leu Ala Ile Gly Ser Leu Ile Ala Ala Thr
1 5 10 15

Ser Phe Gly Val Leu Ala
20

<210> 27
<211> 25
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: signal

<400> 27
Met Met Ile Thr Leu Arg Lys Leu Pro Leu Ala Val Ala Val Ala Ala
1 5 10 15

Gly Val Met Ser Ala Gln Ala Met Ala
20 25

<210> 28
<211> 25
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: signal

<400> 28
Met Lys Lys Met Asn Leu Ala Val Cys Ile Ala Thr Leu Met Gly Thr
1 5 10 15

Ala Gly Leu Met Gly Thr Ala Val Ala

20

25

<210> 29

<211> 23

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: signal

<400> 29

Met Ser Ile Gln His Phe Arg Val Ala Leu Ile Pro Phe Phe Ala Ala
1 5 10 15

Phe Ser Leu Pro Val Phe Ala
20

<210> 30

<211> 21

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: signal

<400> 30

Met Lys Gln Ser Thr Ile Ala Leu Ala Leu Leu Pro Leu Leu Phe Thr
1 5 10 15

Pro Val Thr Lys Ala
20

<210> 31

<211> 21

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: signal

<400> 31

Met Lys Gln Ser Ala Ile Ala Leu Ala Leu Leu Ser Cys Leu Ile Thr

1

5

10

15

Pro Val Ser Gln Ala
20

<210> 32

<211> 27

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: signal

<400> 32

Met Lys Ser Arg Tyr Lys Arg Leu Thr Ser Leu Ala Leu Ser Leu Ser
1 5 10 15

Met Ala Leu Gly Ile Ser Leu Pro Ala Trp Ala
20 25

<210> 33

<211> 24

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: signal

<400> 33

Met Ser Phe His His Arg Val Phe Lys Leu Ser Ala Leu Ser Leu Ala
1 5 10 15

Leu Phe Ser His Leu Ser Phe Ala
20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No
PCT/EP 00/08537

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K14/815 C07K14/24 C07K14/21 C07K14/245 C12N9/02
C12N15/62 C12N1/21 A61P7/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, SCISEARCH, EMBASE, BIOTECHNOLOGY ABS, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| X | US 5 389 529 A (PANAYOTATOS NIKOS ET AL) 14 February 1995 (1995-02-14) see examples column 9, line 29 -column 10, line 4 | 9,10 |
| X | US 5 652 139 A (WONG EDITH ET AL) 29 July 1997 (1997-07-29) column 4, line 51 -column 5, line 67 examples 1-3 | 9,10 |
| X | EP 0 448 093 A (CONSORTIUM ELEKTROCHEM IND) 25 September 1991 (1991-09-25) cited in the application column 5, line 2-32; figure 3 | 6-8 |
| Y | column 4, line 45 -column 5, line 2 --- -/-- | 1,3-5,8 |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 February 2001

Date of mailing of the international search report

28/02/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

ALCONADA RODRIG..., A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr. .nal Application No
PCT/EP 00/08537

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| Y | EP 0 324 712 A (HOECHST AG) 19 July 1989 (1989-07-19) cited in the application page 2, line 5-28; claims 1-6; table 2 --- | 1,3-5,8 |
| A | EP 0 511 393 A (NIPPON MINING CO) 4 November 1992 (1992-11-04) claim 6; examples 1-5 --- | 1-8 |
| A | DE MOT R ET AL: "HOMOLOGY OF THE ROOT ADHESIN OF PSEUDOMONAS-FLUORESCENS OE 28.3 WITH PORIN F OF PSEUDOMONAS-AERUGINOSA AND PSEUDOMONAS-SYRINGAE" MOLECULAR & GENERAL GENETICS, vol. 231, no. 3, 1992, pages 489-493, XP000982041 ISSN: 0026-8925 figure 1 --- | 1,3-10 |
| A | BRAUN G ET AL: "DNA SEQUENCE ANALYSIS OF THE SERRATIA-MARCESCENS OMP-A GENE IMPLICATIONS FOR THE ORGANIZATION OF AN ENTEROBACTERIAL OUTER MEMBRANE PROTEIN" MOLECULAR & GENERAL GENETICS, vol. 195, no. 1-2, 1984, pages 321-328, XP000986721 ISSN: 0026-8925 figures 3,4 --- | 1-10 |
| A | PEALING SARA L ET AL: "Sequence of the gene encoding flavocytochrome c from Shewanella putrefaciens: A tetraheme flavoenzyme that is a soluble fumarate reductase related to the membrane-bound enzymes from other bacteria." BIOCHEMISTRY, vol. 31, no. 48, 1992, pages 12132-12140, XP000982039 ISSN: 0006-2960 figure 3 ----- | 1-10 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/08537

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| US 5389529 A | 14-02-1995 | AU 2238792 A | 12-01-1993 |
| | | CA 2111110 A | 23-12-1992 |
| | | EP 0590059 A | 06-04-1994 |
| | | IE 921888 A | 16-12-1992 |
| | | JP 6508036 T | 14-09-1994 |
| | | NZ 243084 A | 28-08-1995 |
| | | PT 100580 A | 30-09-1993 |
| | | WO 9222665 A | 23-12-1992 |
| | | ZA 9204313 A | 31-03-1993 |
| US 5652139 A | 29-07-1997 | US 5958754 A | 28-09-1999 |
| | | US 5084384 A | 28-01-1992 |
| | | US 5489517 A | 06-02-1996 |
| | | AT 109828 T | 15-08-1994 |
| | | AU 607209 B | 28-02-1991 |
| | | AU 1509188 A | 27-10-1988 |
| | | CA 1314507 A | 16-03-1993 |
| | | DE 3850995 D | 15-09-1994 |
| | | DE 3850995 T | 16-03-1995 |
| | | EP 0288451 A | 26-10-1988 |
| | | ES 2007309 T | 01-11-1994 |
| EP 0448093 A | 25-09-1991 | DE 4009268 A | 26-09-1991 |
| | | AT 135042 T | 15-03-1996 |
| | | AU 640212 B | 19-08-1993 |
| | | AU 7368091 A | 03-10-1991 |
| | | BR 9101104 A | 05-11-1991 |
| | | CA 2038888 A,C | 23-09-1991 |
| | | CN 1055010 A | 02-10-1991 |
| | | DE 59107495 D | 11-04-1996 |
| | | DK 448093 T | 09-04-1996 |
| | | ES 2084052 T | 01-05-1996 |
| | | FI 911009 A | 23-09-1991 |
| | | GR 3019946 T | 31-08-1996 |
| | | HU 214368 B | 30-03-1998 |
| | | IE 910738 A | 25-09-1991 |
| | | IL 97323 A | 10-01-1997 |
| | | JP 2078163 C | 09-08-1996 |
| | | JP 4211391 A | 03-08-1992 |
| | | JP 7106157 B | 15-11-1995 |
| | | NO 911137 A | 23-09-1991 |
| | | NZ 237437 A | 25-11-1993 |
| | | NZ 245885 A | 25-11-1993 |
| | | PT 97093 A,B | 29-11-1991 |
| | | RU 2118365 C | 27-08-1998 |
| | | US 5919895 A | 06-07-1999 |
| | | ZA 9102013 A | 24-12-1991 |
| EP 0324712 A | 19-07-1989 | AT 87938 T | 15-04-1993 |
| | | AU 1828488 A | 24-08-1989 |
| | | CA 1339104 A | 29-07-1997 |
| | | CN 1035127 A,B | 30-08-1989 |
| | | DE 58903988 D | 13-05-1993 |
| | | DK 13189 A | 14-07-1989 |
| | | ES 2055149 T | 16-08-1994 |
| | | FI 890127 A,B, | 14-07-1989 |
| | | HU 50502 A,B | 28-02-1990 |
| | | HU 9500596 A | 30-10-1995 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/08537

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| EP 0324712 A | | IE 65354 B | 18-10-1995 |
| | | IL 88925 A | 27-11-1995 |
| | | JP 1924051 C | 25-04-1995 |
| | | JP 2005891 A | 10-01-1990 |
| | | JP 6049719 B | 29-06-1994 |
| | | KR 9709950 B | 19-06-1997 |
| | | LU 90127 A | 06-10-1997 |
| | | NO 176915 B | 13-03-1995 |
| | | NZ 228064 A | 21-12-1990 |
| | | PH 25937 A | 19-12-1991 |
| | | PT 89778 A, B | 04-10-1989 |
| | | US 5180668 A | 19-01-1993 |
| | | DE 3900626 A | 27-07-1989 |
| | | ZA 8900215 A | 23-12-1993 |
| EP 0511393 A | 04-11-1992 | JP 2093433 C | 18-09-1996 |
| | | JP 4173798 A | 22-06-1992 |
| | | JP 7119237 B | 20-12-1995 |
| | | JP 4258294 A | 14-09-1992 |
| | | AT 140929 T | 15-08-1996 |
| | | AT 176500 T | 15-02-1999 |
| | | AU 673870 B | 28-11-1996 |
| | | AU 5470194 A | 24-03-1994 |
| | | AU 648124 B | 14-04-1994 |
| | | AU 8846691 A | 11-06-1992 |
| | | CA 2072375 A | 09-05-1992 |
| | | CA 2255396 A | 09-05-1992 |
| | | DE 69121192 D | 05-09-1996 |
| | | DE 69130872 D | 18-03-1999 |
| | | DE 69130872 T | 26-08-1999 |
| | | DK 511393 T | 09-12-1996 |
| | | DK 687731 T | 20-09-1999 |
| | | EP 0687731 A | 20-12-1995 |
| | | ES 2093717 T | 01-01-1997 |
| | | ES 2129749 T | 16-06-1999 |
| | | FI 922963 A | 26-06-1992 |
| | | GR 3021410 T | 31-01-1997 |
| | | GR 3029824 T | 30-06-1999 |
| | | WO 9208736 A | 29-05-1992 |
| | | NO 303735 B | 24-08-1998 |
| | | NO 982207 A | 07-09-1992 |
| | | US 5573929 A | 12-11-1996 |
| | | US 5516656 A | 14-05-1996 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. nationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/08537

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 C07K14/815 C07K14/24 C07K14/21 C07K14/245 C12N9/02
 C12N15/62 C12N1/21 A61P7/02

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 IPK 7 C12N C07K A61P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
 EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, SCISEARCH, EMBASE, BIOTECHNOLOGY ABS, MEDLINE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| X | US 5 389 529 A (PANAYOTATOS NIKOS ET AL) 14. Februar 1995 (1995-02-14) see examples Spalte 9, Zeile 29 -Spalte 10, Zeile 4 --- | 9,10 |
| X | US 5 652 139 A (WONG EDITH ET AL) 29. Juli 1997 (1997-07-29) Spalte 4, Zeile 51 -Spalte 5, Zeile 67 Beispiele 1-3 --- | 9,10 |
| X | EP 0 448 093 A (CONSORTIUM ELEKTROCHEM IND) 25. September 1991 (1991-09-25) in der Anmeldung erwähnt Spalte 5, Zeile 2-32; Abbildung 3 Spalte 4, Zeile 45 -Spalte 5, Zeile 2 --- | 6-8 |
| Y | --- | 1,3-5,8 |
| | --- -/-- | |

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

20. Februar 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

28/02/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl.
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

ALCONADA RODRIG..., A

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| Y | EP 0 324 712 A (HOECHST AG) 19. Juli 1989 (1989-07-19) in der Anmeldung erwähnt Seite 2, Zeile 5-28; Ansprüche 1-6; Tabelle 2 ---- | 1,3-5,8 |
| A | EP 0 511 393 A (NIPPON MINING CO) 4. November 1992 (1992-11-04) Anspruch 6; Beispiele 1-5 ---- | 1-8 |
| A | DE MOT R ET AL: "HOMOLOGY OF THE ROOT ADHESIN OF PSEUDOMONAS-FLUORESCENS OE 28.3 WITH PORIN F OF PSEUDOMONAS-AERUGINOSA AND PSEUDOMONAS-SYRINGAE" MOLECULAR & GENERAL GENETICS, Bd. 231, Nr. 3, 1992, Seiten 489-493, XP000982041 ISSN: 0026-8925 Abbildung 1 ---- | 1,3-10 |
| A | BRAUN G ET AL: "DNA SEQUENCE ANALYSIS OF THE SERRATIA-MARCESCENS OMP-A GENE IMPLICATIONS FOR THE ORGANIZATION OF AN ENTEROBACTERIAL OUTER MEMBRANE PROTEIN" MOLECULAR & GENERAL GENETICS, Bd. 195, Nr. 1-2, 1984, Seiten 321-328, XP000986721 ISSN: 0026-8925 Abbildungen 3,4 ---- | 1-10 |
| A | PEALING SARA L ET AL: "Sequence of the gene encoding flavocytochrome c from Shewanella putrefaciens: A tetraheme flavoenzyme that is a soluble fumarate reductase related to the membrane-bound enzymes from other bacteria." BIOCHEMISTRY, Bd. 31, Nr. 48, 1992, Seiten 12132-12140, XP000982039 ISSN: 0006-2960 Abbildung 3 ----- | 1-10 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/08537

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| US 5389529 A | 14-02-1995 | AU 2238792 A | 12-01-1993 |
| | | CA 2111110 A | 23-12-1992 |
| | | EP 0590059 A | 06-04-1994 |
| | | IE 921888 A | 16-12-1992 |
| | | JP 6508036 T | 14-09-1994 |
| | | NZ 243084 A | 28-08-1995 |
| | | PT 100580 A | 30-09-1993 |
| | | WO 9222665 A | 23-12-1992 |
| | | ZA 9204313 A | 31-03-1993 |
| US 5652139 A | 29-07-1997 | US 5958754 A | 28-09-1999 |
| | | US 5084384 A | 28-01-1992 |
| | | US 5489517 A | 06-02-1996 |
| | | AT 109828 T | 15-08-1994 |
| | | AU 607209 B | 28-02-1991 |
| | | AU 1509188 A | 27-10-1988 |
| | | CA 1314507 A | 16-03-1993 |
| | | DE 3850995 D | 15-09-1994 |
| | | DE 3850995 T | 16-03-1995 |
| | | EP 0288451 A | 26-10-1988 |
| | | ES 2007309 T | 01-11-1994 |
| EP 0448093 A | 25-09-1991 | DE 4009268 A | 26-09-1991 |
| | | AT 135042 T | 15-03-1996 |
| | | AU 640212 B | 19-08-1993 |
| | | AU 7368091 A | 03-10-1991 |
| | | BR 9101104 A | 05-11-1991 |
| | | CA 2038888 A,C | 23-09-1991 |
| | | CN 1055010 A | 02-10-1991 |
| | | DE 59107495 D | 11-04-1996 |
| | | DK 448093 T | 09-04-1996 |
| | | ES 2084052 T | 01-05-1996 |
| | | FI 911009 A | 23-09-1991 |
| | | GR 3019946 T | 31-08-1996 |
| | | HU 214368 B | 30-03-1998 |
| | | IE 910738 A | 25-09-1991 |
| | | IL 97323 A | 10-01-1997 |
| | | JP 2078163 C | 09-08-1996 |
| | | JP 4211391 A | 03-08-1992 |
| | | JP 7106157 B | 15-11-1995 |
| | | NO 911137 A | 23-09-1991 |
| | | NZ 237437 A | 25-11-1993 |
| | | NZ 245885 A | 25-11-1993 |
| | | PT 97093 A,B | 29-11-1991 |
| | | RU 2118365 C | 27-08-1998 |
| | | US 5919895 A | 06-07-1999 |
| | | ZA 9102013 A | 24-12-1991 |
| EP 0324712 A | 19-07-1989 | AT 87938 T | 15-04-1993 |
| | | AU 1828488 A | 24-08-1989 |
| | | CA 1339104 A | 29-07-1997 |
| | | CN 1035127 A,B | 30-08-1989 |
| | | DE 58903988 D | 13-05-1993 |
| | | DK 13189 A | 14-07-1989 |
| | | ES 2055149 T | 16-08-1994 |
| | | FI 890127 A,B, | 14-07-1989 |
| | | HU 50502 A,B | 28-02-1990 |
| | | HU 9500596 A | 30-10-1995 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/08537

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| EP 0324712 A | | IE 65354 B | 18-10-1995 |
| | | IL 88925 A | 27-11-1995 |
| | | JP 1924051 C | 25-04-1995 |
| | | JP 2005891 A | 10-01-1990 |
| | | JP 6049719 B | 29-06-1994 |
| | | KR 9709950 B | 19-06-1997 |
| | | LU 90127 A | 06-10-1997 |
| | | NO 176915 B | 13-03-1995 |
| | | NZ 228064 A | 21-12-1990 |
| | | PH 25937 A | 19-12-1991 |
| | | PT 89778 A, B | 04-10-1989 |
| | | US 5180668 A | 19-01-1993 |
| | | DE 3900626 A | 27-07-1989 |
| | | ZA 8900215 A | 23-12-1993 |
| EP 0511393 A | 04-11-1992 | JP 2093433 C | 18-09-1996 |
| | | JP 4173798 A | 22-06-1992 |
| | | JP 7119237 B | 20-12-1995 |
| | | JP 4258294 A | 14-09-1992 |
| | | AT 140929 T | 15-08-1996 |
| | | AT 176500 T | 15-02-1999 |
| | | AU 673870 B | 28-11-1996 |
| | | AU 5470194 A | 24-03-1994 |
| | | AU 648124 B | 14-04-1994 |
| | | AU 8846691 A | 11-06-1992 |
| | | CA 2072375 A | 09-05-1992 |
| | | CA 2255396 A | 09-05-1992 |
| | | DE 69121192 D | 05-09-1996 |
| | | DE 69130872 D | 18-03-1999 |
| | | DE 69130872 T | 26-08-1999 |
| | | DK 511393 T | 09-12-1996 |
| | | DK 687731 T | 20-09-1999 |
| | | EP 0687731 A | 20-12-1995 |
| | | ES 2093717 T | 01-01-1997 |
| | | ES 2129749 T | 16-06-1999 |
| | | FI 922963 A | 26-06-1992 |
| | | GR 3021410 T | 31-01-1997 |
| | | GR 3029824 T | 30-06-1999 |
| | | WO 9208736 A | 29-05-1992 |
| | | NO 303735 B | 24-08-1998 |
| | | NO 982207 A | 07-09-1992 |
| | | US 5573929 A | 12-11-1996 |
| | | US 5516656 A | 14-05-1996 |